

Ocena wertykalnej transmisji dwóch gatunków ureaplazm u donoszonych noworodków bez zaburzeń oddechowych – badania wstępne

Evaluation of vertical transmission of two species of Ureaplasmas in term newborns without respiratory disorders – a preliminary study

Biernat-Sudolska Małgorzata¹, Rojek-Zakrzewska Danuta¹, Rzepecka-Węglarz Beata³, Kosz-Vnenchak Magdalena^{1,2}

¹ Zakład Wirusologii i Katedra Mikrobiologii UJ, Collegium Medicum Kraków, Polska

² Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii UJ WBBiB, Kraków, Polska

³ Szpital-Położniczo-Ginekologiczny „Ujastek”, Oddział Neonatologiczny, Kraków, Polska

Streszczenie

Ciąża sprzyja kolonizacji ureaplazmami dróg rodnych kobiet. Stwarza to możliwość wertykalnego przeniesienia tych drobnoustrojów na dziecko. Drobnoustroje te nie tylko mogą być przyczyną komplikacji w okresie ciąży, ale także mogą niekorzystnie wpływać na stan kliniczny noworodka.

Cel pracy: Celem pracy była analiza wertykalnej transmisji *U. parvum* i *U. urealyticum* u noworodków urodzonych o czasie, bez zaburzeń oddechowych.

Materiały i Metody: analizą objęto 50 matek oraz 50 ich nowonarodzonych dzieci. Do badania pobierano wymazy z szyjki macicy matek oraz aspiraty tchawicze od noworodków. Obecność ureaplazm potwierdzano metodą hodowlaną oraz PCR. Identyfikację gatunkową ureaplazm przeprowadzano metodą PCR.

Wyniki: zakażenie ureaplazmami stwierdzono u 21 kobiet (42%). Przeważały zakażenia gatunkiem *U. parvum* (18 kobiet). Jedynie u 3 zakażonych kobiet potwierdzono obecność *U. urealyticum*. Jednoczesne zakażenie ureaplazmowe u matki i jej dziecka potwierdzono u 8 (17,4%) par matka-dziecko, w tym w 6 takich przypadkach wykazano obecność gatunku *U. parvum*, a w 2 *U. urealyticum*. Częstość wertykalnej transmisji zakażenia ureaplazmami oceniono wstępnie na 33% dla *U. parvum* oraz na 67% dla *U. urealyticum*, a ogółem dla obu gatunków na 38%. Należy podkreślić, iż z grupy 18 kobiet zakażonych *U. parvum* aż w 12 przypadkach nie doszło do przekazania zakażenia dziecku. Natomiast u 3 kobiet zakażonych *U. urealyticum* w 2 przypadkach obserwowano transmisję z matki na dziecko (67%). Pomimo, że grupę zakażoną *U. urealyticum* stanowiły tylko 3 kobiety, nasze wstępne obserwacje mogą sugerować, że najprawdopodobniej częściej dochodzi do przeniesienia tego gatunku z matki na dziecko.

Wnioski: wstępne obserwacje wskazują, iż najprawdopodobniej zakażenie gatunkiem *U. urealyticum* może być łatwiej przenoszone z dróg rodnych matki na dziecko niż zakażenie gatunkiem *U. parvum*.

Słowa kluczowe: ureaplazma / wertykalna transmisja / noworodki /

Adres do korespondencji:

Małgorzata Biernat-Sudolska
Zakład Wirusologii, Katedra Mikrobiologii UJ Collegium Medicum
ul. Czysa 18, 31-121 Kraków, Polska
tel./fax: 12 634-54-00
e-mail: msudolsk@cm-uj.krakow.pl

Otrzymano: 25.02.2011
Zaakceptowano do druku: 29.04.2011

Abstract

Pregnancy promotes ureaplasma vaginal colonization. This creates the possibility of vertical transmission of these organisms to the child. These microorganisms can cause complications during pregnancy and poor condition of newborn.

Objectives: Objectives of this study were to analyze the vertical transmission of different species of ureaplasmas in term newborns without respiratory distress.

Materials and Methods: The study included 50 mothers and 50 of their newborn children. Swabs were obtained from swabs of the cervix in women and tracheal aspirates from neonates. The presence of ureaplasmas was confirmed by culture and PCR. Ureaplasmas species identification was performed using PCR.

Results: infection of ureaplasmas was found in 21 women (42%). Predominant species was *U. parvum*, which was found in 18 women. In 3 patients only the presence of *U. urealyticum* was confirmed. Ureaplasma infection in mother and her newborn baby was confirmed in 8 (17.4%) mother-child pairs, including 6 of these cases showing the presence of *U. parvum* and 2 *U. urealyticum*. The incidence of vertical transmission of ureaplasma infection was assessed at 33% for *U. parvum* and 67% for *U. urealyticum*, and the total for both species at 38%. It should be noted that in the group of 18 women infected with *U. parvum*, in 12 cases there was no transmission of infection to the child. However, in 3 women infected with *U. urealyticum* 2 cases of transmission from mother to child were observed (67%). Although the group infected with *U. urealyticum* accounted for only 3 women, our preliminary observations may suggest that this species is probably more likely to be transferred from mother to child.

Conclusions: Infection with *U. urealyticum* may be more frequently transferred from the genital tract of mother to child.

Key words: **ureaplasma / vertical transmission / newborns /**

Rodzaj *Ureaplasma* należy do rodziny *Mycoplasmataceae*. Drobnoustroje te mają zdolność przylegania do wielu różnych komórek ludzkiego organizmu np. erytrocytów, neutrofilów, plemników a także komórek nabłonkowych dróg moczowo-płciowych. Produkt ich metabolizmu-amoniak może wywoływać lokalny efekt cytotatyczny. Uważa się, że ureaplazmy, jako składnik fizjologicznej flory żeńskich dróg moczowo-płciowych, charakteryzuje niska wirulencja. Jednak nadmierna kolonizacja dróg rodnych tymi drobnoustrojami ($>10^4$) może być przyczyną komplikacji w przebiegu ciąży, takich jak: przedwczesne pęknięcie błon płodowych, przedwczesny poród [1].

Kolonizacja dróg rodnych ureaplazmami nasila się zwłaszcza w trzecim trymestrze ciąży. Stwarza to możliwość przeniesienia zakażenia na noworodki. Do zakażenia ureaplazmami może dojść jeszcze w życiu płodowym *in utero* (drogą hematogenną lub jako wynik wstępującej infekcji) albo podczas porodu na skutek kontaktu dziecka z wydzieliną zakażonego kanału rodowego matki. Drobnoustroje te kolonizują głównie drogi oddechowe noworodków, a ich obecność może stać się przyczyną licznych objawów klinicznych w tym zaburzeń oddechowych [2, 3].

Zakażony noworodek wymaga niejednokrotnie intensywnego leczenia i wspomagania oddychania, a szybkie potwierdzenie zakażenia umożliwia także szybszą interwencję terapeutyczną. Czulość metod molekularnych w wykrywaniu zakażeń ureaplazmowych jest wyższa w porównaniu do czulości uzyskanej przy zastosowaniu klasycznej hodowli [4].

Także czas oczekiwania na wynik jest zdecydowanie krótszy. Ponadto jedynie przy zastosowaniu metod molekularnych jest możliwa identyfikacja gatunkowa dwóch gatunków ureaplazm występujących u ludzi (*Ureaplasma parvum* i *Ureaplasma urealyticum*).

Cel pracy

Celem naszej pracy była próba określenia, który z dwóch gatunków ureaplazm izolowanych od ludzi częściej przenoszony jest drogą wertykalną.

Metody

Analizą objęto 50 kobiet oraz 50 ich nowonarodzonych dzieci. Dzieci pochodziły z ciąż donoszonych (poród ≥ 37 tygodnia życia płodowego), prawidłowych. We wszystkich przypadkach poród odbył się siłami natury. Średnia masa urodzeniowa badanych noworodków wynosiła 3505g. Nie stwierdzano u nich zaburzeń oddechowych. Oceny w skali Apgar dokonywano po pierwszej minucie życia noworodka, a wartość modalna oceny w skali Apgar wynosiła 10.

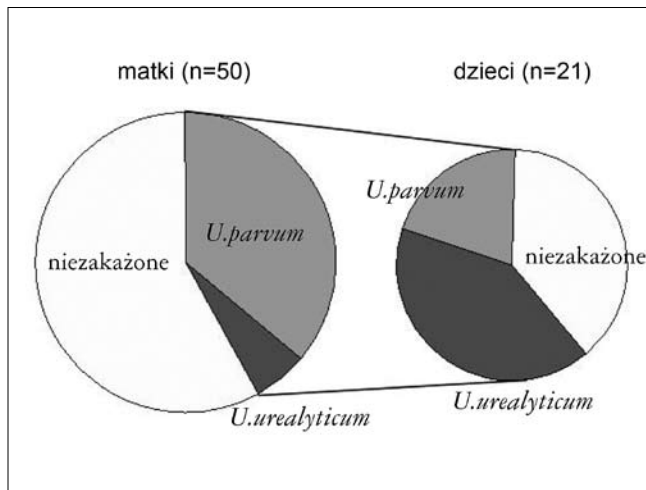
Materiałem do badania był wymaz krtaniowy w przypadku noworodków pobierany w pierwszych 24 godzinach życia i wymaz z dróg rodnych w przypadku badanych kobiet. Wymazy od kobiet pobierano w chwili przyjęcia ciężarnej do szpitala celem odbycia porodu. Materiał pobierano do podłoża transportowego firmy BioMerieux. Obecność ureaplazm potwierdzano metodą hodowli na podłożach PPLO wg Hayflicka, oraz metodą amplifikacji DNA [4, 5].

Oceny ilościowej zakażenia dokonywano testami Mycoplasma IST 2 firmy BioMerieux określając masowość zakażenia w 2 przedziałach: I. $\geq 10^4$ CCU/ml i II. $<10^4$ CCU/ml.

Identyfikację gatunkową ureaplazm przeprowadzano metodą PCR stosując startery dla genu ureazy UUS2c/ UUA2c dla gatunku *U. urealyticum*; oraz UPS2c/ UPA2c swoistych dla gatunku *U. parvum* [6]. Kontrolę dodatnią stanowiło DNA szczepów wzorcowych *U. urealyticum* ATCC 27816 i *U. parvum* ATCC 27815.

W celu identyfikacji gatunku ureaplazm dokonywano izolacji DNA ureaplazm z podłoża R2 firmy BioMerieux w 24 godzinie inkubacji. Warunki PCR i profil amplifikacji opisano wcześniej [4].

Detekcję produktu PCR przeprowadzano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Prążki uwidaczniano w świetle UV.



Rycina 1. Proporcjonalny udział zakażeń *U. parvum* i *U. urealyticum* u 21 dzieci urodzonych przez zakażone matki.

Wyniki

Wśród przebadanych 50 ciężarnych kobiet zakażenie ureaplazmami stwierdzono u 21 z nich, co stanowi 42%. Przeważały zakażenia gatunkiem *U. parvum*, które potwierdzono u 18 kobiet. Jedynie u 3 zakażonych kobiet potwierdzono obecność *U. urealyticum*. Jednoczesne zakażenie ureaplazmowe u matki i jej nowonarodzonego dziecka wykazano u 8 (17,4%) par matka-dziecko. W 6 przypadkach wykazano obecność gatunku *U. parvum*, a w 2 *U. urealyticum*.

We wszystkich przypadkach zarówno kobieta jak i jej dziecko skolonizowane były tym samym gatunkiem ureaplazm. Aż u 12 z analizowanych kobiet wykazano zakażenie *U. parvum*, nie potwierdzając jednocześnie obecności tych drobnoustrojów w drogach oddechowych noworodka. Proporcjonalny udział zakażeń *U. parvum* i *U. urealyticum* u 21 dzieci urodzonych przez zakażone matki przedstawia rycina 1.

U wszystkich kobiet oraz u jednego dziecka zakażonych *U. urealyticum* stopień kolonizacji określono na $\geq 10^4$ CCU/ml. Natomiast w przypadku *U. parvum* zakażenie $\geq 10^4$ CCU/ml potwierdzono u 83% kobiet i 43% noworodków. Zarówno u kobiet jak i noworodków zakażenie *U. parvum* rzadziej przybierało masyną postać.

Częstość wertykalnej transmisji zakażenia ureaplazmami oceniono wstępnie na 33% dla *U. parvum* oraz na 67% dla *U. urealyticum*, a ogółem dla obu gatunków ureaplazm na 38%. W przypadku obecności *U. parvum* w drogach rodnych matki do wertykalnej transmisji dochodziło głównie gdy stwierdzano kolonizację $\geq 10^4$ CCU/ml. Tylko w jednym przypadku doszło do wertykalnego przeniesienia zakażenia pomimo miana $\leq 10^4$ CCU/ml.

Dyskusja

Ureaplazmy są częstym składnikiem flory pochwy aktywnych seksualnie kobiet i mogą być czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych w obrębie układu moczowo-płciowego [7].

Niektóre dane literaturowe podają, iż u 40-80% kobiet w drogach moczowo-płciowych wykrywa się te drobnoustroje [8, 9]. Zdecydowanie częściej potwierdza się obecność gatunku

U. parvum zarówno u osób dorosłych jak i w aspiratach tchawiczych noworodków. Nie wiadomo jednak, który z dwóch gatunków ureaplazm łatwiej jest przenoszony drogą wertykalną.

Ciąża jest jednym z czynników predysponujących do zmiany biocenozy pochwy, sprzyjając kolonizacji dróg płciowych licznymi drobnoustrojami, w tym także z rodziny *Mycoplasmataceae*. W literaturze opisywano uporczywą kolonizację ureaplazmami utrzymującą się od drugiego trymestru ciąży [10]. W obecnych badaniach częstość kolonizacji ureaplazmami dróg rodnych ciężarnych określono na 42%. We wcześniejszych badaniach własnych (badania niepublikowane) porównywano częstość izolacji ureaplazm w grupie 76 kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży, oraz 44 kobiet z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych do częstości izolacji w grupie kontrolnej, którą stanowiło 99 kobiet nieciężarnych, poddawanych badaniom profilaktycznym. Odsetek izolacji określony w poszczególnych grupach badanych wynosił kolejno: 49%, 75%, w porównaniu do 20% w grupie kontrolnej. Był więc znacząco wyższy zarówno u kobiet z ciążą prawidłową jak i powikłaną. Określona przez nas częstość izolacji ureaplazm, w niniejszej pracy jak i w badaniach prowadzonych wcześniej wskazuje, że w okresie ciąży wzrasta częstość kolonizacji tymi drobnoustrojami dróg rodnych kobiet. Tendencja wzrostowa jest szczególnie widoczna w przebiegu ciąży powikłanej (przedwczesne pęknięcie błon płodowych).

Rodzaj porodu może wpływać na możliwość przeniesienia drobnoustrojów z matki na dziecko. W naszych badaniach ureaplazmy izolowano z dróg oddechowych 17,4% noworodków urodzonych drogami natury. Iwasaka i wsp. obserwował wyższą wertykalną transmisję w przypadku dzieci urodzonych naturalnie w porównaniu do dzieci urodzonych drogą cesarskiego cięcia, natomiast Sanches i wsp. nie potwierdzali takich obserwacji [11, 12].

Także długość trwania ciąży oraz masa urodzeniowa dziecka wpływają na uzyskane wyniki dotyczące stopnia skolonizowania noworodka przez ureaplazmy. Kolonizacja ureaplazmami dzieci przedwześnie urodzonych z bardzo niską masą urodzeniową jest częstsza w porównaniu do częstości stwierdzanej u dzieci urodzonych o czasie, z masą ciała powyżej 1500g [12, 14]. Również Kafetsis ocenia, iż stopień wertykalnej transmisji ureaplazm w przypadku kobiet rodzących o czasie wynosi 17% i jest niższy w porównaniu do kobiet rodzących przedwześnie (33%).

Naszymi badaniami objęliśmy dzieci urodzone w planowanym terminie (poród po 37 tygodniu ciąży) ze średnią masą urodzeniową 3405g, a wysoka ocena w skali Apgar wskazywała na dobry stan kliniczny noworodków. A zatem w przypadku naszych badań na możliwość przeniesienia ureaplazm z matki na dziecko nie wpływały takie czynniki jak przedwczesny poród, niska masa urodzeniowa czy zaburzenia oddechowe.

W badaniach prowadzonych przez Alfa i wsp. w grupie 104 kobiet rodzących w planowanym terminie stopień wertykalnej transmisji określono na 25,9% ogółem dla obu gatunków ureaplazm. Nasze badania objęły wprawdzie mniejszą liczebnie grupę kobiet, ale określony przez nas stopień transmisji wertykalnej wahał się od 33% dla *U. parvum* do 67% w przypadku *U. urealyticum* i zdecydowanie był wyższy od danych przedstawionych przez Alfa MJ i wsp. [14]. Pomimo, że grupę zakażoną *U. urealyticum* stanowiły tylko 3 kobiety nasze wstępne obserwacje mogą sugerować, że częściej dochodzi do przeniesienia tego gatunku z matki na dziecko.

Nie jest jasna różnica w patogenności obu gatunków ureaplazm. Według Katz i wsp. oraz Heggie i wsp. ryzyko rozwoju dysplazji oskrzelowo-płucnej u noworodków zakażonych *U. parvum* i *U. urealyticum* jest podobne [8, 15]. Abele-Horn oceniła szansę rozwoju dysplazji oskrzelowo-płucnej u dzieci skolonizowanych *U. urealyticum* na 56%, a w przypadku *U. parvum* na 25% [16]. Prace publikowane przez nas wcześniej także potwierdzały gorszy stan kliniczny noworodków skolonizowanych przez *U. urealyticum* [17]. Z kolei Culterer R. podkreśla związek *U. parvum* z zaburzeniami oddechowymi noworodków [18].

Mamy nadzieję, że badania z zastosowaniem technik molekularnych, obejmujące większą liczbę przypadków pozwolą nam bardziej precyzyjnie określić czy rzeczywiście jeden z dwóch gatunków ureaplazm jest łatwiej przekazywany z matki na dziecko oraz który z nich wykazuje wyższą patogenność.

Wnioski

Nasze wstępne obserwacje wskazują, iż najprawdopodobniej zakażenie gatunkiem *U. urealyticum* może być łatwiej przenoszone z dróg rodnych matki na dziecko niż zakażenie gatunkiem *U. parvum*.

Praca została zgłoszona na konferencję pt. „Badania molekularne w położnictwie i ginekologii – możliwy element strategii klinicznej”, która odbyła się dnia 8 kwietnia 2011 r. w Poznaniu.

Piśmiennictwo

1. Regan J, Greenberg E, Ellen M. Perinatal *Ureaplasma urealyticum* infection and colonization: the association with preterm delivery and the spectrum of disease in neonates. *Rev Med Microbiol.* 2001, 12, 97-107.
2. Schelonka R, Waites K. *Ureaplasma* infection and neonatal lung disease. *Semin Perinatol.* 2007, 31, 2-9.
3. Waites K, Katz B, Schelonka R. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005, 18, 757-789.
4. Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska, Lauterbach R. Assessment of various diagnostic methods of *ureaplasma* respiratory tract infections in newborns. *Acta Biochim Pol.* 2006, 53, 609-611.
5. Hayflick L. The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria. New York: *Meredith Corporation.* 1965.
6. Kong F, Ma Z, James G, [et al.]. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Mikrobiol.* 2000, 38, 1175-1179.
7. Katz B, Patel P, Duffy L, [et al.]. Characterization of ureaplasmas isolated from preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Microbiol.* 2005, 43, 4852-4854.
8. Sung T. *Ureaplasma* infections in pre-term infants: Recent information regarding the role of *Ureaplasma* species as neonatal pathogens. *Korean J Pediatr.* 2010, 53, 989-93.
9. Koch A, Bilina A, Teodorowicz L, Stary A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. *Wien Klin Wochenschr.* 1997, 109, 584-89.
10. Iwasaka T, Wada T, Kidera T, Sugimori H. Genital mycoplasma colonization in neonatal girls. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1986, 65, 269-272.
11. Sanches P. Perinatal transmission of *Ureaplasma urealyticum*: current concepts based on review of literature. *Clin Infect Dis.* 1993, 17, 107-111.
12. Kafetzis D, Skevaki C, Skouteri V, [et al.]. Maternal genital colonization with *Ureaplasma urealyticum* promotes preterm delivery: association of the respiratory colonization of premature infants with chronic lung disease and increased mortality. *Clin Infect Dis.* 2004, 39, 1113-1121.
13. Alfa M, Embree J, Degagne P, [et al.]. Transmission of *Ureaplasma urealyticum* from mothers to full and preterm infants. *Pediatr Infect Dis J.* 1995, 14, 341-45.
14. Heggie A, Bar-Shain D, Boxerbaum B, [et al.]. Identification and quantification of ureaplasmas colonizing the respiratory tract and assessment of their role in the development of chronic lung disease in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2001, 20, 854-859.
15. Abele-Horn A, Wolff C, Dressel, [et al.]. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol.* 1997, 35, 1199-1202.
16. Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Rzepecka-Węglarz B, [i wsp.]. Wpływ zakażenia ureaplazmami na stan kliniczny noworodków. *Przegl Epidemiol.* 2006, 60, 53-8.
17. Cultera R, Saraceni S, Germani R, Contini C. Molecular evidence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureoplasma parvum* colonization in preterm infants during respiratory distress syndrome. *BMC Infect Dis.* 2006, 6, 166-172.